

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: B200426030

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

对虾白斑综合症病毒结构蛋白的
鉴定及功能研究

Identification and Functional Analysis of
Structural Proteins of White Spot Syndrome Virus

谢希贤

指导教师姓名: 杨丰 徐洵 教授

专 业 名 称: 生化与分子生物学

论文提交日期: 2007 年 04 月

论文答辩时间: 2007 年 04 月

学位授予日期: 2007 年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2007 年 04 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。

本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
前言	5
1 对虾白斑综合症病毒(WSSV)及其分子生物学研究	5
1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况	5
1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及其命名	5
1.1.2 对虾白斑综合症病毒的大小和形态结构	6
1.1.3 对虾白斑综合症病毒的感染宿主及感染动物模型	7
1.1.4 对虾白斑综合症病毒的组织病理学	7
1.2 对虾白斑综合症病毒的分离及主要检测技术	8
1.2.1 对虾白斑综合症病毒的分离纯化	8
1.2.2 对虾白斑综合症病毒的检测	9
1.3 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究	12
1.4 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究	14
1.4.1 对虾白斑综合症病毒的结构蛋白	14
1.4.2 对虾白斑综合症病毒的功能酶类	19
1.4.3 对虾白斑综合症病毒的其他功能基因	21
2 本论文研究的内容、目的和意义	23
第一部分 对虾白斑综合症病毒结构蛋白的质谱鉴定及生化分析	25
1 前言	25
2 材料和方法	25
2.1 材料	25
2.2 方法	25
2.2.1 WSSV 完整病毒和核衣壳的制备	25
2.2.2 WSSV 结构蛋白质谱鉴定	27
2.2.3 多克隆抗体的制备	28
2.2.4 Western blot 分析	28
2.2.5 WSSV 结构蛋白糖基化分析	28

3 结果	29
3.1 病毒粒子纯化及膜蛋白、核衣壳蛋白的分离	29
3.2 WSSV 结构蛋白的质谱鉴定	31
3.3 部分质谱鉴定的结构蛋白的 Western blot 分析	34
3.4 病毒结构蛋白的生化分析	35
4 讨论	36
第二部分 对虾白斑综合症病毒膜蛋白 VP26 的功能研究	40
1 前言	40
2 材料和方法	40
2.1 材料	40
2.2 方法	40
2.2.1 重组 VP26 (rVP26)和 Actin (rActin)的表达纯化	40
2.2.2 rVP26 与病毒核衣壳的相互作用	41
2.2.3 异硫氰酸荧光黄荧光标记 rVP26	42
2.2.4 细胞结合实验	42
2.2.5 rVP26 亲和柱制备	42
2.2.6 亲和层析纯化与 VP26 相互作用的细胞蛋白	42
2.2.7 免疫共沉淀	43
3 结果	43
3.1 vp26 基因的结构	43
3.2 rVP26 的诱导表达和纯化	44
3.3 VP26 在病毒粒子中的定位	45
3.4 VP26 的细胞结合活性	46
3.5 rVP26 亲和柱纯化特异的结合蛋白并进行质谱鉴定	47
3.6 免疫共沉淀	48
4 讨论	49
第三部分 对虾白斑综合症病毒结构蛋白 VP24 的功能研究	52
1 前言	52
2 材料和方法	52

2.1 材料	52
2.2 方法	52
2.2.1 Triton X-114 处理完整病毒粒子	52
2.2.2 VP24 的免疫电镜定位	52
2.2.3 抗血清的 Protein A 纯化	53
2.2.4 体内中和实验	53
3 结果	54
3.1 <i>vp24</i> 基因的结构	54
3.2 重组 VP24 (rVP24)的诱导表达和纯化	54
3.3 VP24 在病毒粒子中的定位	55
3.4 VP24 抗体的体内中和实验	57
4 讨论	58
第四部分 对虾白斑综合症病毒结构蛋白之间以及与螯虾细胞膜蛋白之间的相互作用	60
1 前言	60
2 材料和方法	60
2.1 材料	60
2.2 方法	61
2.2.1 Ni-NTA 柱变性条件下纯化重组蛋白及蛋白复性	61
2.2.2 生物素标记目的蛋白	61
2.2.3 Far-Western 分析	61
2.2.4 螯虾细胞膜蛋白提取	61
3 结果	62
3.1 重组 VP28 (rVP28)的诱导表达和纯化	62
3.2 VP28 与 VP26 以及 VP28 与 VP24 之间的相互作用	62
3.3 与病毒膜蛋白结合的细胞膜蛋白的分离	64
4 讨论	65
参考文献	67
缩略词	81

附录 1 主要仪器设备、常规溶液配制和常规实验方法.....	82
附录 2 对虾白斑综合症病毒结构蛋白质谱测定及序列比对.....	91
博士期间发表的文章.....	102
致谢.....	103

厦门大学博士论文摘要库

CONTENTS

Chinese abstract	1
English abstract	3
Introduction	5
1 White spot syndrome virus (WSSV) and molecular biological research	5
1.1 Research of white spot syndrome virus.....	5
1.1.1 Find and naming of white spot syndrome virus.....	5
1.1.2 Size and structure of white spot syndrome virus.....	6
1.1.3 Host and animal model of white spot syndrome virus.....	7
1.1.4 Pathology of white spot syndrome virus.....	7
1.2 Isolation and detection technology of white spot syndrome virus.....	8
1.2.1 Purification of white spot syndrome virus.....	8
1.2.2 Detection of white spot syndrome virus.....	9
1.3 Genomics of white spot syndrome virus.....	12
1.4 Proteomics of white spot syndrome virus.....	14
1.4.1 Structural proteins of white spot syndrome virus.....	14
1.4.2 Functional enzymes of white spot syndrome virus.....	19
1.4.3 Other functional genes of white spot syndrome virus.....	21
2 Investigations in this thesis and their significance	23
Part I MS identification and biochemical analysis of structural proteins of white spot syndrome virus	25
1 Introduction	25
2 Materials and methods	25
2.1 Materials.....	25
2.2 Methods.....	25
2.2.1 Preparation of WSSV intact virions and nucleocapsids.....	25
2.2.2 MS identification of WSSV structural proteins.....	27
2.2.3 Preparation of polyclonal antibodies.....	28
2.2.4 Western blot analysis.....	28
2.2.5 Glycosylation analysis of WSSV structural proteins.....	28
3 Results	29
3.1 Virion purification and separation of envelope and nucleocapsid proteins.....	29

3.2 MS identification of WSSV structural proteins.....	31
3.3 Western blot analysis of some structural proteins.....	34
3.4 Biochemical analysis of structural proteins.....	35
4 Discussion.....	36
Part II Functional analysis of envelope protein VP26 of WSSV.....	40
1 Introduction.....	40
2 Materials and methods.....	40
2.1 Materials.....	40
2.2 Methods.....	40
2.2.1 Expression and purification of recombinant VP26 (rVP26) and Actin (rActin).....	40
2.2.2 Interaction of rVP26 and nucleocapsid.....	44
2.2.3 FITC label of rVP26.....	42
2.2.4 Cell binding assay.....	42
2.2.5 Preparation of affinity chromatographic column of rVP26.....	42
2.2.6 Purification of VP26-binding proteins by affinity chromatography.....	42
2.2.7 Coimmunoprecipitation.....	43
3 Results.....	43
3.1 Structure of <i>vp26</i> gene.....	43
3.2 Expression and purification of rVP26.....	44
3.3 Localization of VP26 within virion.....	45
3.4 Cell binding characteristics of VP26.....	46
3.5 Purification and MS identification of VP26-binding proteins.....	47
3.6 Coimmunoprecipitation.....	48
4 Discussion.....	49
Part III Functional analysis of envelope protein VP24 of WSSV.....	52
1 Introduction.....	52
2 Materials and methods.....	52
2.1 Materials.....	52
2.2 Methods.....	52
2.2.1 Triton X-114 treatment of intact virion.....	52
2.2.2 Localization of VP24 by immuno-electron microscopy.....	52
2.2.3 Purification of antiserum by Protein A.....	53

2.2.4 Neutralization <i>in vivo</i>	53
3 Results	54
3.1 Structure of <i>vp24</i> gene.....	54
3.2 Expression and purification of recombinant VP24 (rVP24).....	54
3.3 Localization of VP24 within virion.....	55
3.4 Neutralization of VP24 antibody <i>in vivo</i>	57
4 Discussion	58
Part IV Interactions between envelope proteins and between viral envelope proteins with cellular membrane proteins	60
1 Introduction	60
2 Materials and methods	60
2.1 Materials.....	60
2.2 Methods.....	61
2.2.1 Purification of recombinant protein under denature condition and protein renature.....	61
2.2.2 Biotinylation of target protein.....	61
2.2.3 Far-Western analysis.....	61
2.2.4 Isolation of crayfish membrane proteins.....	61
3 Results	62
3.1 Expression and purification of recombinant VP28 (rVP28).....	62
3.2 Interaction between VP28 with VP26 and VP24.....	62
3.3 Isolation of cellular proteins that interact with viral envelope proteins.....	64
4 Discussion	65
References	67
Abbreviation	81
Appendix I Instrument, solution and routine methods	82
Appendix II MALDI mass spectra of structural proteins	91
Publication	102
Acknowledge	103

摘 要

对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是线形病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(Whispovirus)中一种新型的 DNA 病毒,是养殖对虾中一种主要的病害。它的宿主范围广,传染力强,致死率高,难防治,不仅严重危害对虾养殖,还对海洋环境构成威胁。本论文对病毒主要膜蛋白和核衣壳蛋白的鉴定及生化属性进行了全面的蛋白质学分析。另外本论文还开展了病毒主要结构蛋白的功能和相互作用的研究。

WSSV 病毒粒子从感染病毒的克氏螯虾 *Procambarus clarkii* 组织里被提取出来。纯的病毒样品经去污剂 Triton X-100 处理后分成膜部分和核衣壳部分,随后两部分的蛋白通过 12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和特异的抗体,主要的膜蛋白和核衣壳蛋白被鉴定。本文中,总共有 30 种病毒结构蛋白被鉴定,其中 22 种位于膜部分,7 种位于核衣壳部分,另外还有 1 种蛋白在膜和核衣壳部分都被检测到。利用制备的特异性抗体,8 种结构蛋白的定位被进一步研究。另外,蛋白翻译后修饰分析显示所有的结构蛋白都没有糖基化和乙酰化,VP28 和 VP19 存在苏氨酸磷酸化。

病毒 wsv311 基因的产物 VP26 是病毒的一个主要结构蛋白。当病毒粒子用 Triton X-100 处理时,VP26 被发现在膜和核衣壳部分都有存在。我们认为 VP26 可能定位于病毒的膜与核衣壳之间。利用荧光标记方法,我们探索了 VP26 与宿主细胞蛋白之间的相互作用。通过亲和柱层析,3 种能与 VP26 结合的蛋白从螯虾的血细胞中被纯化出来,其中分子量约 42 kDa 的蛋白经质谱鉴定为肌动蛋白(Actin)。免疫共沉淀分析证实了 VP26 与肌动蛋白微丝之间的相互作用。

病毒 wsv002 基因的产物 VP24 是病毒的一个主要结构蛋白,早期的研究认为 VP24 是核衣壳蛋白。本文对 VP24 在病毒粒子的精确定位进行了研究。当病毒粒子用 Triton X-100 处理时,VP24 被发现只存在于膜部分。Triton X-114 的抽提也显示 VP24 是一个穿膜蛋白。免疫电镜观察进一步证实了 VP24 定位在病毒的囊膜上。为了探索 VP24 的功能,纯化的病毒与不同量的 VP24 抗体的 IgG 温育后注射螯虾。结果显示 VP24 抗体的 IgG 能部分减弱病毒的感染。我们认为 VP24 是病毒的一个可能在病毒感染早期起作用的膜蛋白。

最后我们探索了病毒膜蛋白之间以及病毒膜蛋白与宿主膜蛋白之间的相互作用。Far-Western 实验和免疫共沉淀分析显示 VP28 能与 VP26 和 VP24 相互作用。另外, 通过亲和层析, 一条分子量约 22 kDa 的能与病毒膜蛋白结合的细胞膜蛋白被纯化, 质谱鉴定该蛋白为一个环腺苷酸(cAMP)受体蛋白。总之, 本论文获得的数据将为进一步研究病毒侵入及组装的分子机制提供重要的参考。

关键词: 对虾白斑综合症病毒; 结构蛋白; 相互作用

Abstract

White Spot Syndrome Virus (WSSV) represents a new genus of DNA viruses, *Whispovirus*, belonging to the *Nimaviridae* family, and is a major pathogen in the cultured *penaeid* shrimp. It has a wide range of hosts in crustaceans, a high infection and mortality rate, and is hard to be controlled. Therefore WSSV is not only a major threat to the shrimp industry but also to the marine environment. In this thesis, a comprehensive proteomic analysis was made to define and characterize the major envelope and nucleocapsid proteins of WSSV. Moreover, the functional exploration and interaction of WSSV structural proteins was investigated.

WSSV virions were purified from the tissues of infected crayfish *Procambarus clarkii*. Pure WSSV preparations were subjected to Triton X-100 treatment to separate into the envelope and nucleocapsid fractions, which were subsequently separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The major envelope and nucleocapsid proteins were identified by either matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) or defined antibody. A total of 30 structural proteins of WSSV were identified in this study; 22 of these were detected in the envelope fraction, 7 in the nucleocapsid fraction and 1 in both the envelope and the nucleocapsid fractions. With the aid of specific antibodies, the localization of 8 proteins was further studied. Moreover, the analysis of post-translational modifications revealed that none of WSSV structural protein was glycosylated and acetylated, and VP28 and VP19 were threonine-phosphorylated.

VP26, the product of the wsv311 gene of WSSV, is one major structural proteins of virus. When purified virions were treated with Triton X-100 detergent, VP26 protein was present in both the envelope and the nucleocapsid fraction. We have rationalized this finding by suggesting that VP26 protein might be located in the space between the envelope and the nucleocapsid. By using a fluorescent probe method, we have investigated the interaction between VP26 protein and some proteins of host cells. Three major VP26-binding proteins were purified from crayfish hemocytes by affinity-chromatography, in which the protein with an apparent molecular mass of 42 kDa was identified as Actin by mass spectrometry (MS). Moreover, the association of VP26 protein with Actin microfilaments was confirmed by coimmunoprecipitation.

VP24, the product of the wsv002 gene of WSSV, is one major structural protein

of virus and thought to be a nucleocapsid protein in the previous report. In this study, a more precise localization of VP24 within WSSV virions was carried out. When purified virions were subjected to Triton X-100 treatment to separate the envelopes from the nucleocapsids, VP24 was found to present exclusively in the envelope fraction. Triton X-114 extraction also indicated that VP24 behaves as an envelope protein. Immunoelectron microscopy further confirmed that VP24 is located in the envelope of virion. To investigate the function of VP24, WSSV was incubated with various amount of anti-VP24 IgG and injected into crayfish. The result showed that anti-VP24 IgG could partially attenuate infection with WSSV. We concluded that VP24 is an envelope protein and functions at an early stage in virus infection.

Finally, interactions between envelope proteins and between viral envelope proteins with cellular membrane proteins were investigated. Far-Western and coimmunoprecipitation experiment showed that VP28 interacted with both VP26 and VP24. In addition, an envelope-protein-binding protein with an apparent molecular mass of 22 kDa were purified from membrane of crayfish hemocytes by affinity-chromatography and identified as a cAMP receptor protein by MS. In summary, the data obtained in this study should provide an important reference for future molecular studies of WSSV morphogenesis.

Key words: White spot syndrome virus; Structural proteins; Interaction

前 言

1 对虾白斑综合症病毒(WSSV)及其分子生物学研究

1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况

1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及其命名

对虾为甲壳动物(*Crustacea*)十足目(*Decapoda*)对虾科(*Penaeidae*)对虾属(*Penaeus*)的统称,是具重要经济价值的浅海产大型游泳虾类。1988 年前后,我国台湾地区发生养殖斑节对虾(主要是草虾)大规模死亡的事件,这是世界范围内首次出现所谓的“虾瘟”,检测发现其主要病原是一种新型的杆状病毒。1990 年,首次在泰国中、南部地区出现了一种在对虾甲壳内有肉眼可见的白斑的虾病,由于病虾表现为另一更为明显的黄头症状(由黄头杆状病毒引起),因此与白斑有关的病原未引起重视。1992 年,台湾养殖的斑节对虾、长毛对虾、日本对虾开始出现在短期内大量死亡的现象,发病严重的对虾头胸甲部位可见大量的白斑。通过电镜观察在对虾病变细胞核中发现大量无包涵体的杆状病毒。用此病毒感染健康对虾后,也出现相同的结果,白斑综合症开始成为对虾养殖中危害最大的病害之一。1993 年春,日本养殖对虾大量发生白斑综合症而死亡。同年 5-8 月,中国沿海从南到北的对虾养殖场暴发全国性大规模白斑综合症,养殖对虾产量锐减。随后白斑综合症开始传遍亚洲和印度太平洋地区的绝大多数对虾养殖场。1995 年 10 月,西半球报道了第一例对虾白斑病。目前,对虾白斑综合症是全球范围内限制养虾业发展的最主要因素。

自 1992 以来,各地研究人员在白斑综合症的研究中发现一种新型的非包涵体型杆状病毒是主要致病病原,但根据所分离病毒株的地域分布、原始宿主、形态发生以及主要病理症状,给不同分离株赋予了不同的名称^[1-10],见表 1。Lo 等^[11]用 PCR 技术比较研究了从不同地域(中国、印度、美国、泰国)分离的对虾白斑病毒 DNA,发现 PCR 产物只有少许差别。根据以上研究结果,结合发病对虾在临床症状、感染组织、病理变化、流行特点,可以看出各地发现的白斑综合症病毒差异很小,应为同一种新型病毒。由于 1995 年第 6 次国际病毒学会议后,无包涵体型杆状病毒不再归属于杆状病毒科,Lightner 等^[12]建议将这类杆状病毒统一命名为白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV),这一建议得到了国际虾类病毒研究者的普遍认可。

表 1: 各地报道的对虾白斑病毒的命名

缩写(Abbreviation)	英文全称(Whole name)
LN BV	Lymphoid cell nuclear baculovirus
RV-PJ	Rod-shaped nuclear virus of <i>Penaeus japonicus</i>
HHNBV	Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus
NOSV	Non-occluded shrimp virus
PcBLV	<i>Penaeus chinensis</i> baculo-Like virus
SEMBV	Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus
PmNOB II	<i>Paeneis monodon</i> non-occluded baculovirus II
MBV	<i>Penaeus monodon</i> type baculovirus
PRDV	Penaeid rod-shaped DNA virus
PAV	Penaeid acute viremia
CBV	Chinese baculovirus
PCBV	<i>Penaeus chinensis</i> baculovirus
WSBV	White spot syndrome baculovirus
WSDV	White spot disease virus
WSV	White spot virus
WSSV	White spot syndrome virus

1.1.2 对虾白斑综合症病毒的大小和形态结构

不同研究者发现不同地域不同宿主的 WSSV 的形态结构十分相似。电子显微镜负染观察^[9,10,13,14]显示:完整的病毒粒子横切面为圆形,纵切面为杆状而略带椭圆,大小约 380-250 nm × 75-100 nm,直径约 90-100 nm,一端略平带轻微凹陷,一端略细,略细端有一细长鞭毛状结构,大小约 40 nm × 50 nm,无包涵体;病毒粒子的最外层是由 2 层单位膜组成的囊膜,两膜之间有较宽阔的间隙;紧接囊膜向内是核衣壳,大小约为 380-330 nm × 80-60 nm;病毒的核衣壳结构为螺旋排列的亚单位形成的圆柱体,两端各有一帽状结构,一端为较扁的梯形,另一端为三角锥形;螺旋带与核衣壳长轴垂直,螺距 30nm,每匝螺旋宽 26 nm,螺旋间距 4 nm;核衣壳螺旋由籽粒构成,每个籽粒单位由 2 个边缘颗粒和 1 个中间颗粒组成,呈“<”形结构,籽粒排列周期为 14 nm。核酸存在于核衣壳中。病毒粒子主要存在于对虾的细胞核中^[3,6,8,10,15-20],但也有报道从福州地区分离到的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库